

УДК 53.087/.088

## ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРЫ СЛОЕВ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОСЕНСОРОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФРАКТАЛЬНОГО АНАЛИЗА

*А.В. Маркеева, Э.Р. Шаймухаметова, О.А. Коновалова,  
М.Э. Сибгатуллин, Д.З. Галимуллин, М.Х. Салахов*

### Аннотация

Работа посвящена решению проблемы анализа и классификации биологических структур и неорганических подложек по изображениям атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием методов фрактального анализа. Показано, что указанные подходы могут быть использованы для количественного описания структур, образующих биосенсор.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, фрактальный анализ, биосенсор, неорганические подложки, классификация.

### Введение

Работа посвящена проблеме исследования поверхности биологических слоев наносенсоров. Важной задачей является анализ физических и морфологических свойств биослоя, например, ДНК-содержащей пленки на поверхности пьезокварцевого биосенсора [1]. Одним из эффективных методов исследования различных поверхностей является атомно-силовая микроскопия (АСМ), позволяющая визуализировать процесс изготовления биосенсора послойно, что дает возможность получать изображения поверхностей слоев и рассчитывать ряд феноменологических характеристик [2]. Однако АСМ не позволяет оценивать топографические свойства поверхности и её геометрические характеристики, реально отражающие процессы формирования поверхностного рельефа [3]. Часто также в процессе изучения возникает проблема: не всегда возможно определить различия между биологическими слоями, образующими наносенсор. В работе мы исследуем возможность применения методов фрактального анализа [4] для описания структуры нанослоев, оценки однородности распределения биологических макромолекул и исследования свойств образовавшихся кластеров.

### 1. Эксперимент

Первым этапом работы было получение изображения поверхностей при помощи АСМ. Визуализацию всех исследуемых поверхностей проводили на ACM Solver Pro (Москва НИИФП, ЗАО «НТ-МДТ»), сканер 3 мкм. В процессе визуализации исследуемых объектов были использованы кремниевые кантилеверы NSG11 (ЗАО «НТ-МДТ») (длина балки  $L = 100$  мкм с коэффициентом жесткости 11.5 Н/м, резонансная частота находилась в пределах  $190 \div 275$  kHz). Типичный радиус кривизны острия кантилеверов был менее 10 нм. Сканирование проводили полуконтактным методом на воздухе в трех режимах: при постоянной амплитуде (топография), в режиме фазового контраста и сигнала рассогласования с разрешением  $1024 \times 1024$  точек. Снимались кадры размером  $3 \times 3$  мкм [5–7].

Подготовка исследуемых образцов проводилась по методике, описанной в работе [6]. Для изготовления сенсора на подложку послойно наносились: слой полиэлектrolита полилизина, слой ДНК, бычий сывороточный альбумин (БСА), сыворотка крови, содержащая антитела к ДНК.

## 2. Методы анализа

Фрактальные измерения, в отличие от физических и технических, имеют своей целью количественную оценку структуру поверхности, определение масштабной инвариантности и самоподобия формы, фрактальной размерности носителя меры, меры хаотичности структуры, выявление асимметрии структуры и особенностей кинетики роста и т. п. В настоящее время предложено несколько методов фрактального анализа изображений в сканирующей зондовой микроскопии [8, 9]. В работе рассматривается возможность использования показателя Херста и размерности Хаусдорфа–Безиковича при исследовании поверхностей слоев биологических наносенсоров.

Одним из методов построения оптимальных оценок показателя Херста  $H$  является статистический метод нормированного размаха или  $R/S$ -анализ, предложенный Херстом [10]. В данной работе для определения показателя Херста используется следующая процедура

Пусть  $\{x(t)\}$  – некоторый случайный процесс. Для анализируемой выборки  $\{x_i = x(t_i)\}$ ,  $(i = 0, \dots, T)$  находится сумма случайных значений

$$X_\tau(t) = \sum_{i=1}^t (x_i - \langle x \rangle_\tau), \quad 1 \leq t \leq \tau \leq T, \quad (1)$$

где  $\langle x \rangle_\tau$  – среднее выборки на интервале  $[0, \tau]$ . Затем вычисляется функция размаха  $R(\tau)$  как разность между максимальным и минимальным значениями функции  $X_\tau(t)$ :

$$R(\tau) = \max_{t \in [1, \tau]} X_\tau(t) - \min_{t \in [1, \tau]} X_\tau(t). \quad (2)$$

Херст эмпирически показал, что отношение  $R/S$  описывается степенным законом:

$$R/S = (a\tau)^H, \quad (3)$$

где  $a$  – произвольный параметр,  $H$  – показатель Херста,  $S$  – среднеквадратичное отклонение, определяемое стандартным соотношением

$$S(\tau) = \left[ \frac{1}{\tau} \sum_{i=1}^{\tau} (x_i - \langle x \rangle_\tau)^2 \right]^{1/2}. \quad (4)$$

Таким образом, показатель Херста можно оценить, аппроксимируя экспериментальные результаты уравнением (3).

При расчете размерности Хаусдорфа–Безиковича исходно производилось сечение плоскостью трехмерного изображения топографии исследуемого наносенсора по горизонтали на определенной высоте. Получаемое двумерное изображение среза подвергалось обработке при помощи так называемого «box-counting» метода [9]. Суть его такова: квадраты различного размера  $\varepsilon$  выстраивают в сетку и помещают эту сетку на изображение. Затем подсчитывают количество квадратов, включающих элемент поверхности  $N_\varepsilon$ , в зависимости от величины стороны квадрата  $\varepsilon$ . Размерность Хаусдорфа–Безиковича (фрактальный параметр) согласно данному

методу определяется по наклону линии регрессии в двойных логарифмических координатах зависимости  $N_\varepsilon$  от  $\varepsilon$ :

$$D_{bc} = \frac{\ln(N_\varepsilon)}{\ln(1/\varepsilon)}. \quad (5)$$

С помощью специально разработанной программы были получены зависимости  $\ln N(\varepsilon) = f(\ln \varepsilon)$  для каждого слоя исследуемой поверхности, где  $\ln N(\varepsilon) = f(\ln \varepsilon)$  – зависимость числа квадратных масок  $N(\varepsilon)$  от величины стороны квадрата  $\varepsilon$ , построенная в двойных логарифмических координатах. Далее по углу наклона зависимости  $\ln N(\varepsilon) = f(\ln \varepsilon)$  определяется фрактальная размерность как отношение  $D = -\ln N(\varepsilon)/\ln \varepsilon = \operatorname{tg} a$ , и строятся графики зависимости  $\operatorname{tg} a = f(h)$ , где  $h$  – высота среза.

### 3. Результаты

В работе в качестве подложек использовали золотой электрод, образованный напылением золота на полированную поверхность кварцевого резонатора и пластинки свежесколотой слюды (GRHS/2.0). Для создания биосенсора необходимо сформировать селективный чувствительный слой на поверхности электродов пьезокварца, на который в дальнейшем следует иммобилизовать ДНК, так как молекулы ДНК не сорбируются непосредственно на золотую поверхность пьезокварцевого резонатора.

При помощи АСМ были получены изображения биологического слоя полиэлектролита полилизина, адсорбированного на золотую поверхность полированного пьезокварцевого резонатора и на поверхность слюды при трех различных молекулярных массах полиэлектролита полилизина: МI = 4 кДа, МII = 58 кДа, МIII = 412 кДа).

По полученным АСМ-изображениям довольно сложно проанализировать структуру адсорбированного на золото слоя предшественника – полилизина и сделать выводы о том, как рассматриваемый биологический объект адсорбировался на исследуемую поверхность, так как золотой электрод, напыленный на пьезокварцевый резонатор, обладает гранулированной шероховатой поверхностью.

Были получены данные изменения величины показателя Херста для изображений поверхности образцов в зависимости от изучаемого слоя. На рис. 1 приведены полученные результаты.

Анализируя рис. 1, можно предположить, что поверхность золотого электрода имеет достаточно неупорядоченную структуру. Это характеризуется большим размахом значений показателя Херста. Среднее значение данной величины составляет  $0.735 \pm 0.02$ , а после адсорбции слоя полилизина поверхностная структура становится более однородной, как бы «сглаживается», и среднее значение показателя Херста становится равным  $0.888 \pm 0.17$ . В случае слюды, поверхность которой является близкой к атомарно-ровной, показатель Херста имеет небольшой размах значений в достаточно узком диапазоне, среднее значение которого равно  $1.02 \pm 0.35$ . Отсюда следует вывод, что атомарно-гладкая поверхность (в частности, слюды) характеризуется параметром Херста, близким к единице. После нанесения слоя полилизина структура на поверхности становится неоднородной, о чем свидетельствует больший размах значений и меньшее среднее значение показателя Херста, которое составляет  $0.855 \pm 0.41$ .

На рис. 2–4 представлены графики, полученные в результате обработки последовательно нанесенных слоев наносенора по АСМ-изображениям с помощью фрактального анализа. На рис. 5 представлены гистограммы высоты наносенсора в зависимости от нанесенных слоев.

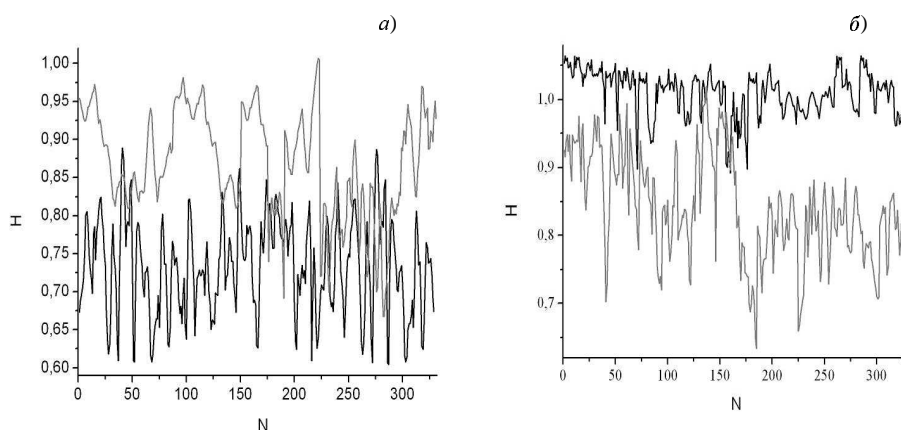


Рис. 1. а) Зависимость показателя Херста  $H$  от номера строки сканирования  $N$  для поверхности золотого электрода (1) и биологического слоя полиэлектролита полилизина ( $MП = 58$  кДа), адсорбированного на золотую поверхность пьезокварцевого резонатора (2); б) зависимость показателя Херста  $H$  от номера строки сканирования  $N$  для поверхности слюды (1) и биологического слоя полиэлектролита полилизина ( $MП = 58$  кДа), адсорбированного на поверхность слюды (2)

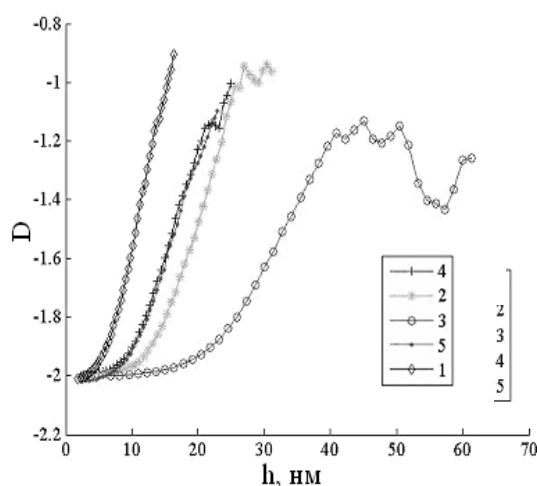


Рис. 2. Масса I. Зависимость фрактальной размерности  $D$  от высоты среза  $h$  для поверхности наносенсора, образованного последовательно нанесенными слоями: 1 – золота, 2 – полилизина, 3 – ДНК, 4 – БСА, 5 – сыворотки крови, содержащей антитела к ДНК

В табл. 1 приведены результаты вычисления фрактальной размерности Хаусдорфа–Безиковича последовательно нанесенных слоев наносенсора по АСМ-изображениям, полученные с помощью «box-counting» метода.

По результатам обработки АСМ-изображений была выявлена зависимость фрактального параметра для определенных слоев от массы полилизина – слоя предшественника для ДНК. Характерные значения этой зависимости представлены в табл. 1. Из таблицы следует вывод, что с увеличением массы слоя-предшественника ДНК полилизина фрактальный параметр поверхности, образованной золотым электродом и полилизином, уменьшается до величины 1.9 и

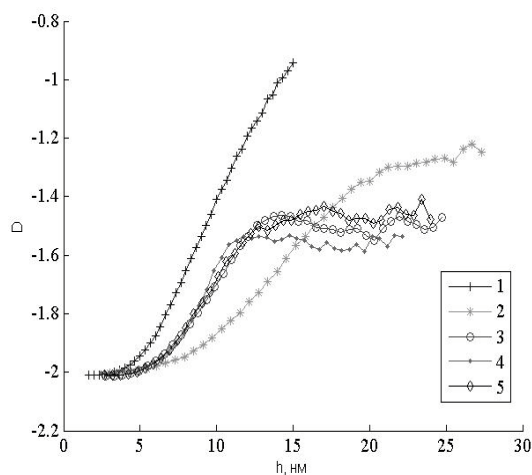


Рис. 3. Масса II. Зависимость фрактальной размерности  $D$  от высоты среза  $h$  для поверхности наносенсора, образованного последовательно нанесенными слоями: 1 – золота, 2 – полилизина, 3 – ДНК, 4 – БСА, 5 – сыворотки крови, содержащей антитела к ДНК

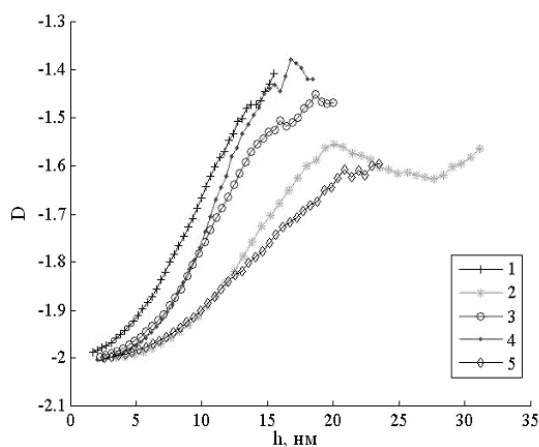


Рис. 4. Масса III. Зависимость фрактальной размерности  $D$  от высоты среза  $h$  для поверхности наносенсора, образованного последовательно нанесенными слоями: 1 – золота, 2 – полилизина, 3 – ДНК, 4 – БСА, 5 – сыворотки крови, содержащей антитела к ДНК

значительно отличается от значения фрактальной размерности для поверхности золотого электрода.

Из гистограмм на рис. 5 следует, что при последовательной иммобилизации биослоев наблюдается значительное изменение максимальной высоты рельефа наносенсора. Вероятно, это говорит о том, что в зависимости от молекулярной массы полилизина вся структура биосенсора, по-разному «проседая», заполняет впадины шероховатой золотой подложки.

#### 4. Выводы

В ходе работы была исследована возможность применения методов фрактального анализа в атомно-силовой микроскопии. В качестве количественной характе-

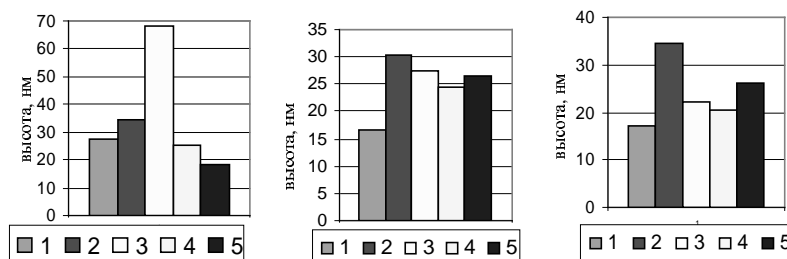


Рис. 5. Гистограммы высот наносенсора при массах полилизина I, II, III соответственно, образованного последовательно нанесенными слоями: 1 – золота, 2 – полилизина, 3 – ДНК, 4 – БСА, 5 – сыворотки крови, содержащей антитела к ДНК

Табл. 1

Фрактальный параметр  $D$  для каждого слоя наносенсора при массах I, II, III полилизина на фиксированной высоте в 10 нм

Слой	Золото	Золото и полилизин	Золото, полилизин, ДНК	Золото, полилизин, ДНК, БСА	Золото, полилизин, ДНК, БСА сыворотка крови, содержащая антитела к ДНК
$D(MI)$	1.61	1.97	2	1.9	1.91
$D(MII)$	1.44	1.92	1.73	1.67	1.7
$D(MIII)$	1.66	1.9	1.77	1.75	1.9

ристики для классификации биоструктур и подложек по АСМ-изображениям были использованы показатель Херста и размерность Хаусдорфа – Безиковича. Показана возможность определения различия в морфологии биологических слоев и неорганических подложек, когда невозможно четко визуализировать данные структуры методами АСМ. Это позволяет исследовать слои, формирующиеся на поверхности подложки, что в дальнейшем может быть использовано при создании биосенсоров с заданными характеристиками.

Показано, что фрактальная размерность  $D$  практически линейно зависит от высоты среза  $h$  наносенсора для золотого электрода. У всех исследуемых биологических объектов выявлено наличие области постоянства фрактальной размерности слоев, последовательно нанесенных на поверхность наносенсора.

Работа выполнена при поддержке гранта НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века», гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10200.2006.2).

### Summary

*A.V. Markeeva, E.R. Shaimukhametova, O.A. Kononova, M.E. Sibgatullin, D.Z. Galimullin, M.Kh. Salakhov.* Approaches to Researching the Structure of Biological Nanosensor Layers by the Fractal Analysis.

This work is devoted to solving the problem of analysis and classification of biological structures and non-organic substrates by images of atomic force microscopy (AFM) with the use of fractal analysis methods. It is shown that the specified approaches can be used for the quantitative description of the structures forming the biosensor.

**Key words:** atomic force microscopy, fractal analysis, biosensor, non-organic substrates, classification.

### Литература

1. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера и др. – М.: Мир, 1992. – 614 с.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. – М.: Техносфера, 2004. – 144 с.
3. Бухараев А.А., Овчинников Д.В., Бухараева А.А. Диагностика поверхности с помощью сканирующей силовой микроскопии (обзор) // Заводская лаб. Диагностика материалов. – 1997. – № 5. – С. 10–27.
4. Mandelbrot B.B. The Fractal Geometry of Nature. – N. Y.: W.H. Freeman and Company, 1982. – 480 p.
5. Яковлева Ю.В., Шагададина А.И., Коновалова О.А., Нагулин К.Ю. Определение масс – чувствительности пьезокварцевого биосенсора и исследование ее поверхности методом АСМ // Когерентная оптика и оптическая спектроскопия: Сб. ст. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – С. 231–238.
6. Фахруллин Р.Ф., Коновалова О.А., Нагулин К.Ю., Винтер В.Г. Изучение сорбции биологического чувствительного слоя на поверхности электродов пьезокварцевого наносенсора // Когерентная оптика и оптическая спектроскопия: Сб. ст. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – С. 239–244.
7. Коновалова О.А., Невзорова Т.А., Винтер В.Г., Салахов М.Х. Сканирование молекул ДНК полуконтактным методом АСМ // Когерентная оптика и оптическая спектроскопия: Сб. ст. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – С. 89–94.
8. Тарасов С.Ю., Колубаев А.В., Липницкий А.Г. Применение фракталов к анализу процессов трения // Письма в ЖЭТФ. – 1999. – Т. 25, № 3. – С. 82–88.
9. Арутюнов П.А., Толстихина А.Л., Демидов В.Н. Система параметров для анализа шероховатости и микрорельефа поверхности материалов в сканирующей зондовой микроскопии // Заводская лаб. Диагностика материалов. – 1998. – № 9. – С. 27–37.
10. Салахов М.Х., Харинцев С.С. Математическая обработка и интерпретация спектроскопического эксперимента. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2001. – 238 с.

Поступила в редакцию  
26.02.08

---

**Маркеева Анна Владимировна** – студент кафедры оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

**Шаймухаметова Эльвира Рамилевна** – студент кафедры оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: [eshaimukhametova@mail.ru](mailto:eshaimukhametova@mail.ru)

**Коновалова Ольга Анатольевна** – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: [Olga.Konovalova@ksu.ru](mailto:Olga.Konovalova@ksu.ru)

**Сибгатуллин Мансур Эмерович** – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: [sibmans@rambler.ru](mailto:sibmans@rambler.ru)

**Галимуллин Дамир Зиннурович** – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: [gaimullin\\_d.z@mail.ru](mailto:gaimullin_d.z@mail.ru)

**Салахов Мякзюм Хамимуллович** – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: [msalakh@ksu.ru](mailto:msalakh@ksu.ru)